

Pesquisas citológicas sobre o *Trypanozoma rotatorium* GRUBY

POR

Astrogildo Machado.

(Com as estampas 7 e 8.)

Zytologische Untersuchungen ueber *Trypanosoma rotatorium* GRUBY

VON

Astrogildo Machado.

(Mit Tafel 7 und 8.)

I. INTRODUÇÃO.

MATERIAL E TECNICA.

As rãs (*Leptodactylus ocellatus*) existentes nos arredores de MANGUINHOS apresentam-se frequentemente parasitadas pelo *Trypanozoma rotatorium*. Em regra, oferecem um grão de infecção mais intenso, quando jovens.

Ao lado do tripanozomo, encontram-se raramente hemogregarinas.

Examinando, em preparações coradas, o sangue de algumas destas rãs, encontramos aspetos interessantes do tripanozomo, pelo que resolvemos fazer algumas pesquisas, no intento de elucidar pontos ainda obscuros na biologia deste protozoario.

Nossos estudos limitam-se apenas á citologia do parasito no sangue do vertebrado, visto como não nos foi possível obter resultados seguros sobre a transmissão delle pelos hirudineos. A este capitulo de transmissibilidade voltaremos, quando

I. EINLEITUNG.

MATERIAL UND TECHNIK.

Die Frösche der Umgebung von MANGUINHOS (*Leptodactylus ocellatus*) zeigen sich häufig mit *Trypanosoma rotatorium* infiziert und zwar ist die Infektion bei jungen Exemplaren gewöhnlich eine stärkere. Seltener finden sich neben den Trypanosomen auch Hämogregarinen.

Während ich in gefärbten Präparaten das Blut einiger dieser Frösche untersuchte, beobachtete ich interessante Formen dieses Trypanosomas und unternahm deshalb einige Untersuchungen, zum Zwecke der Aufklärung mancher noch dunkler Punkte in der Biologie dieses Protozoen.

Meine Untersuchungen beschränkten sich auf die Zytologie der Parasiten im Blute der Frösche, da es mir nicht gelang, über die Uebertragung durch Hirudineen sichere Aufschlüsse zu gewinnen. Auf dieses Kapitel der Uebertragbarkeit werde ich zurückkommen, wenn ich über ge-

dispuzermos de material propicio a tais pesquisas.

No decorrer destas notas não citaremos todos os trabalhos, que, sobre tripanozomos de rãs, têm sido publicados, porque acreditamos, como é a opinião de DOFLEIN (1910), que muitas das variadas formas encontradas no sangue e descritas como especies diversas, não passam de modalidades morficas do proprio *Trypanosoma rotatorium*.

Para as preparações seguimos a tecnica recomendada por ROSENBUSCH. O sangue, colhido nas patas ou por punção no coração, era estendido em laminulas e fixado a humido no sublimado-alcool de SCHAUDINN. Estas passavam, sucessivamente, conforme o tempo necessario, para alcool a 70°, agua, alumen ferrico, hematoxilina; depois de diferenciadas na solução de alumen eram fechadas em balsamo. Os esfregaços de organs, (figado, baço, rins, e pulmão) foram manipulados pelo mesmo processo. O metodo de GIEMSA, a seco, foi tambem empregado, tanto em preparações de sangue como nos esfregaços de organs, a titulo de comparação. Fizemos grande numero de preparações de quazi todos os organs do animal, sem que ellas tivessem dado rezultado pratico, exceção feita das do baço, do figado e principalmente dos rins.

II. MORPHOLOGIA DO PARAZITO NO ORGANISMO DO VERTEBRADO.

Ao examinarmos este parazito, logo nos impressionam as multiplas variantes, que apresenta, tanto em dimensões como em forma, pelo que se torna necessario dividil-as em grupos, para bem descrevel-as. Não adotamos aqui a divizão de LAVERAN e MESNIL (1904), nem a de LEBEDEF (1910), porque é diversa da destes autores a interpretação que damos a tais formas.

Não efetuámos mensurações destes varios elementos porque já são bastante conhecidas e não têm grande importancia,

eignetes Material für solche Studien verfüge.

Bei dieser Mitteilung sehe ich davon ab, sämtliche über Froschtrypanosomen publizierten Arbeiten anzuführen, weil ich mit DOFLEIN (1910) der Ansicht bin, dass viele der abweichenden Formen, welche im Blute beobachtet und als verschiedene Arten beschrieben wurden, nur morphologisch differente Zuständen desselben *Trypanosoma rotatorium* sind.

Bei Herstellung der Präparate befolgte ich die von ROSENBUSCH empfohlene Technik. Das den Pfoten entnommene oder durch Herzpunktion erhaltene Blut wurde auf Deckgläschen ausgestrichen und feucht mit Sublimatalkohol nach SCHAUDINN fixiert. Letztere kamen nach geeigneten Zeiträumen sukzessive in Alkohol von 70°, Wasser, Eisenalaun, und Hämatoxylin; nach Differenzierung in Alaunlösung wurden sie in Balsam eingeschlossen. Die Organausstriche von Leber, Milz, Nieren und Lungen wurden in derselben Weise behandelt. Zum Zwecke des Vergleiches wurden auch Trockenpräparate von Blut und Organen nach GIEMSA gefärbt. Ich machte von allen Organen der Tiere zahlreiche Präparate, aber, abgesehen von Milz und Leber und ganz besonders Nieren, gaben mir dieselben keine praktischen Resultate.

II. MORPHOLOGIE DER PARASITEN.

Bei Untersuchung der Parasiten fallen sofort zahlreiche Unterschiede in Grösse und Form auf, welche behufs besserer Beschreibung in Gruppen gebracht werden müssen.

Ich adoptiere hier weder die Einteilung von LAVERAN und MESNIL (1904), noch die von LEBEDEF (1910), weil meine Deutung solcher Formen eine andere ist, als die jener Autoren.

Ich habe keine Messungen dieser verschiedenen Formen gemacht, weil solche schon genügend bekannt und ohne grosse Wichtigkeit sind, da man bei verschiedenen

visto apresentarem variações em individuos duma mesma forma que se considere.

Dividimos os diferentes aspetos do protozoario observados no organismo da rã, em dois tipos: A) Sexuado, e B) Asexuado.

O primeiro apresenta trez formas predominantes: a) *grandes formas longas*, b) *formas arredondadas*, sem flagelo. c) *pequenas formas longas*. O tipo asexuado oferece grande variedade de aspetos, sem que predomine uma forma carateristica de contorno externo, pelo que os colocamos num só grupo de d) *formas largas*.

A) TIPO SEXUADO.

a) *Grandes formas longas*.

Em preparações pelo metodo de ROSENBUSCH estas formas apresentam estrutura muito nitida. Uma camada fibrilar, o periplasto, envolve uma porção alongada do plasma interno, de aspecto alveolar. Quazi toda a extensão do corpo do tripanozomo é percorrida pela desenvolvida membrana ondulante, de diversas dobras.

O nucleo principal acha-se bem delimitado por espessa membrana, a qual não possui granulações de cromatina em sua face interna. Este nucleo apresenta duas variantes de forma: ora é oval, com o maior diametro dirigido em sentido longitudinal (fig. 1 e 4, est. 7), outras vezes é esferico (figs. 2 e 3, est. 7). Oval ou esferico, elle oferece, por dentro e perto desta membrana, uma camada de linina, disposta concentricamente, quando esferico, e acumulada nos polos, quando oval (fig. 1 e 2, est. 7).

Não se póde apreciar a estrutura desta linina; todavia, notam-se, raras vezes, disposições fibrilares. Nem sempre ella existe na zona de suco nuclear, como nol-o mosta a fig. 3, est. 7; mas em cazo contrario (o que é mais comum), ella limita exterra-

Individuen derselben untersuchten Form Abweichungen findet.

Die verschiedenen im Organismus des Wirtstieres beobachteten Formen theile ich zwei verschiedenen Typen zu: A. Geschlechtstiere und B. Ungeschlechtlicher Typus.

Der erste Typus zeigt drei vorherrschende Formen: a) grosse längliche, b) abgerundete geisellose und c) kleine längliche Formen.

Der geschlechtslose Typus zeigt zahlreiche verschiedene Bilder, ohne Vorwiegen einer charakteristischen Form der äusseren Umrisse, weswegen ich sie in einer Gruppe vereinige, nämlich d) breite Formen.

A) GESCHLECHTLICHER TYPUS.

a) *Grosse längliche Formen*.

In Präparaten nach ROSENBUSCH zeigen diese Formen eine sehr deutliche Struktur. Eine Faserschicht, der Periplast, umhüllt eine längliche Portion von wabig aussehenden Protoplasma. Die gut entwickelte, mehrere Falten aufweisende undulierende Membran folgt fast der gesamten Länge des Körpers.

Der Hauptkern zeigt sich deutlich begrenzt von einer dichten Membran, welche an ihrer Innenseite keine Chromatinkörper aufweist. Dieser Kern zeigt zwei verschiedene Formen; manchmal ist er oval mit längsgerichtetem grösstem Durchmesser. (Fig. 1 & 5, Tafel 7), im andern Falle ist er rund (Fig. 2 & 3, Tafel 7). In beiden Fällen zeigt er nahe der Innenseite dieser Membran eine Schicht von Linin. Letzteres ist beim runden Kerne konzentrisch gelagert, beim ovalen an den Polen aufgehäuft (Fig. 1 & 2, Tafel 7).

Die Struktur dieses Linins lässt sich nicht erkennen, doch bemerkt man in seltenen Fällen eine fibrilläre Anordnung. Nicht immer findet es sich in der Kernsaftzone, wie in Figur 3, Tafel 7; im andern häufiger beobachteten Falle begrenzt es die klare Kernsaftzone nach aussen. Diese Begrenzung wird um so deutlicher, je

mente a zona clara de suco nuclear. Este limite torna-se tanto mais nitido quanto maior fôr a quantidade de linina depozitada no interior do nucleo, chegando a ponto de parecer formar-se nova membrana (fig. 1, est. 7) que circumscreve a zona de suco nuclear com o cariozoma. Que realmente se forma tal membrana, izolando esta zona do resto do nucleo, mostra-nos a fig. 12, est. 7.

Constituindo-se a nova membrana, a outra primitiva e o acumulo de linina são destruidos no plasma. Disto rezultam os aspetos observados nas figs. 1 e 4, est. 7, em que, em torno da atual membrana do nucleo, são vistos (principalmente nos polos d'ele espaços claros como vacuolos, limitados externamente por vestijio de membrana, a qual ainda é bastante apreciavel na fig. 1, est. 7. Estes espaços claros nos polos rezultam da destruição da linina, que aí esteve acumulada. Na fig. 3, est. 7, elles não existem mais, estando aí tambem quazi dezaparecidos os restos da antiga membrana nuclear, representados apenas por tenue semicirculo existente no plasma, para traz do nucleo. A existencia da linina, disposta pelo modo referido, parece ser devido ao cariozoma, que executa pulsações ciclicas.

HARTMANN (1908) viu na *Entamoeba tetragena* aspetos, que, até certo ponto, lembram uma membrana nova em torno do cariozoma, sem contudo estar bem estabelecido este fato. No cazo presente, é muito clara a formação duma membrana, determinada pelas *pulsações ciclicas*.

Pelo que fica exposto, conclue-se que não são tipos diversos de nucleos as formas ovais e esfericas, mas sómente aspetos diferentes dum mesmo nucleo em estadios de evolução periodica, dependentes do maior ou menor depozito de substancia acromatica no seu interior.

O cariozoma, bem delimitado pela zona de suco nuclear, apresenta-se como um grande corpusculo, cuja periferia é

grösser die im Innern des Kernes gelagerte Lininmenge ist, so dass es (Fig. 1, Tafel 7) scheinbar zur Bildung einer neuen Membran kommen kann, welche die Kernsaftzone mit dem Karyosom umschreibt. Dass eine solche Membran, welche diese Zone vom Reste des Kernes trennt, wirklich zu Stande kömmt, geht aus Fig. 12, Tafel 7, hervor.

Wenn sich diese neue Membran bildet, so wird die ursprüngliche, sowie die Lininanhäufungen im Plasma zerstört. So entstehen die Bilder auf Fig. 1—4, Tafel 7, wo man um die gegenwärtige Kernmembran, besonders an den Polen, helle, vakuolenartige und nach aussen von einer kaum angedeuteten Membran begrenzte Räume sieht, wie Fig. 1 noch ziemlich deutlich zeigt. Diese hellen Räume an den Polen entstehen durch Auflösung des daselbst angehäuften Linins. In Fig. 3 sind sie nicht mehr zu sehen und auch die Reste der früheren Kernmembran sind fast verschwunden und nur noch durch einen zarten Halbkreis angedeutet, der hinter dem Kerne im Plasma liegt. Das, wie beschrieben, angeordnete Linin scheint von dem Karyosom abzustammen, welches zyklische Pulsationen ausführt.

HARTMANN sah 1908 bei *Entamoeba tetragena* Bilder, welche, bis zu einem gewissen Grade, einer neuen Membran um das Karyosom ähnlich sahen, jedoch war diese Tatsache nicht ganz sicher gestellt. In unserem Falle ist die durch zyklische Pulsationen bedingte Bildung einer Membran sehr deutlich.

Das eben auseinandergesetzte gestattet den Schluss, dass die runden und ovalen Kerne nicht verschiedene Typen darstellen, sondern nur verschiedene Bilder der gleichen, in periodischer Umwandlung begriffenen, Kerne, welche von der geringeren oder grösseren Ablagerung achromatischer Substanzen in seinem Inneren abhängen.

Das Karyosom, welches durch die klare Kernsaftzone deutlich begrenzt wird, erscheint als ein grosses Körperchen, welches an der Peripherie intensiver ge-

mais intensamente corada que a parte central. Acreditamos que este aspeto, dada a sua constancia, significa maior acumulo de cromatina nos alveolos mais externos da rede de plastina que constitue a trama do cariozoma e não consequencia da fixação. Tal aspeto lembra o observado por HARTMANN (1910) na *Entamoeba testudinis*. As dimensões do cariozoma são variaveis e difficil é saber, si ellas resultam das pulsações ciclicas ou si representam diversidade de sexos. Entretanto os cariozomas das figs. 1 e 4, est. 7, que já realizaram abundantes pulsações (a avaliar pela quantidade de linina existente nas regiões polares do nucleo), são maiores do que os das figs. 2 e 3, est. 7, que ainda não executaram tais pulsações, ou o fizeram em muito pequeno gráo.

Isto faz acreditar que a existencia de cariozomas de tamanhos diversos é fato constante, significando provavelmente distincção de sexos nestas formas do parasito.

Fundado neste criterio (volumes de cariozoma), consideramos machas as formas que apresentam maior cariozoma (figs. 1 e 4, est. 7), e firmas femeas as que o possuem menos volumoso (figs. 2 e 3, est. 7).

No interior do cariozoma acha-se o centriolo, cujo volume é aproximadamente um quinto daquelle do cariozoma do blefaroplasto. Aqui, sua prezença bem evidente constitue um fato a juntar-se ás verificações de CHAGAS (1909) e ROSENBUSCH (1909) que demonstraram categoricamente a existencia deste organ central nos nucleos dos tripanozomidas.

O blefaroplasto oferece a estrutura já conhecida para outros tripanozómidas. A membrana nuclear quazi sempre é vista com muita nitidez; entretanto ha cazos em que ella assim não se apresenta, como na fig. 4, est. 7.

O cariozoma aparece ora alongado transversalmente, ora mais ou menos esférico. O centriolo não pode ser obser-

färbt ist, als im Innern. Wegen seiner Konstanz bedeutet dieses Bild, meines Erachtens, eine stärkere Chromatinanhäufung in den äusseren Maschen des Platinnetzes, welches dem Karyosom zur Stütze dient und ist nicht eine Folge der Fixierungsweise. Es erinnert an das von HARTMANN 1910 bei *Entamoeba testudinis* beobachtete Bild. Die Dimensionen des Karyosoms sind verschieden und es ist schwer zu entscheiden, ob dies durch die zyklischen Pulsationen bedingt ist oder eine sexuelle Differenz repräsentiert. Doch sind die Karyosome der Fig. 1 und 4, die schon zahlreiche Pulsationen ausführten, wie man aus der innerhalb der Kernpole gelegenen Lininmenge schliessen darf, grösser, als die auf Fig. 2 und 3, welche solche Pulsationen gar nicht oder nur in geringem Grade ausgeführt haben. Es stützt dies die Ansicht, dass das Vorkommen von Karyosomen verschiedener Grösse ein konstantes Faktum ist und wahrscheinlich bei diesen Parasitenformen einen Geschlechtsunterschied bedeutet.

Indem ich mich auf dieses Kriterium der Grösse der Karyosomen stütze, sehe ich die Formen mit grösserem Karyosom (Fig. 1 und 4) als männliche und die mit kleinerem (Fig. 2 und 3) als weibliche an.

Im Innern des Karyosoms befindet sich das Zentriol, dessen Volumen ungefähr ein Fünftel desjenigen des Blepharoplastkaryosoms beträgt. Hier bildet sein leicht zu konstatierendes Vorkommen einen neuen Beitrag zu den Beobachtungen von CHAGAS (1909) und ROSENBUSCH (1900), welche in kategorischer Weise das Vorkommen dieses Zentralorgans bei den Trypanosomidenkernen erwiesen.

Der Blepharoplast zeigt die schon von anderen Trypanosomiden bekannte Struktur. Die Kernmembran ist beinahe immer sehr deutlich zu sehen; doch giebt es auch Fälle, wo den nicht so ist, wie in der Fig 4.

Das Karyosom zeigt sich bald queroval, bald rundlich. Das Zentriol konnte nicht beobachtet werden, teils wegen seiner geringen Dimensionen, teils

vado em virtude da sua pequena dimensão e porque o blefaroplasto destas formas longas não sofre divisões binárias.

A estructura do aparelho flagelar nos *binucleata*, revelada pelas memoráveis pesquisas de SCHAUDINN no oocineto do *Hemoproteus noctuae*, mostra-nos que o blefaroplasto, proveniente do nucleo principal, dá orijem, por divisões hetero-polares, ao flajelo, havendo entre aquelle e a baze deste o cone bazal. Este é constituido de fibrilas acromaticas que representam o fuzo perzistente da divisão hetero-polar, as quais envolvem um filamento cromatico central (rizoplasto) que liga o corpusculo do apice do cone ao cariozoma do blefaroplasto.

Nos tripanozomos já adultos, tanto nos de pequeno tamanho, como no que ora é descripto, tais disposições de estrutura não se conservam nitidamente. Nos individuos novos, ellas são muito claras em diversos tripanozomos. Aqui, parece haver exceção para os estádios jovens do parasito encontrados no sangue (fig. 20, est. 7). Esta figura mostra que o blefaroplasto já se dividiu, dando orijem a um corpusculo que a elle está ligado por filamento de cromatina. Este granulo cromatico é o corpusculo bazal e o filamento é o rizoplasto. Tal aspeto parece mostrar que a divisão hetero-polar do blefaroplasto se realizou por simples estiramento do centriolo, sem formação do fuzo acromatico.

Aqui o corpusculo bazal, que sofrerá outras divisões, ficaria incluído na espessura da membrana nuclear, ponto de partida do flajelo; e o rizoplasto existente na zona de suco nuclear, seria reabsorvido, como verificaram HARTMANN e CHAGAS para a *Prowazekia cruzi*.

As preparações coradas pelo metodo de GIEMSA não apresentam as minucias que acabaram de ser referidas nas *grandes formas longas* (figs. 30 e 31, est. 8). Notam-

weil der Blepharoplast dieser länglichen Formen keine Zweiteilung eingeht.

Die Struktur des Geisselapparates bei den *Binukleaten*, welche durch die denkwürdigen Studien SCHAUDINNS an den Ookineten des *Haemoproteus noctuae* aufgeklärt wurde, zeigt, dass der, vom Hauptkerne abstammende, Blepharoplast durch heteropolare Teilung die Geissel hervorbringt, wobei zwischen jenem und der Basis der letzteren der Basalkonus entsteht. Dieser ist von achromatischen Fibrillen gebildet, welche die persistierende Spindel der heteropolaren Teilung repräsentieren und ein zentrales Chromatinfilament, den Rhizoplasten, umgeben, welcher das Korn an der Spitze des Kegels mit dem Karyosom des Blepharoplastes bindet.

Bei den bereits erwachsenen Trypanosomen, sowohl bei denen geringer Grösse, als bei den soeben beschriebenen, bleiben nicht alle Strukturverhältnisse deutlich erhalten. An jungen Individuen sind sie bei den verschiedenen Trypanosomen deutlich erkennbar. Hier scheinen jedoch die Jugendstadien des im Blut vorkommenden Stadiums eine Ausnahme zu bilden (Fig. 20, Tafel 7). Diese Figur zeigt einen Blepharoplasten nach der Teilung, die zur Bildung eines Körperchens führte, welches durch ein Chromatinfilament mit ihm verbunden ist. Dieses Chromatinkorn ist das Basalkörperchen, das Filament ist der Rhizoplast und das Bild deutet an, dass die heteropolare Teilung des Blepharoplasts durch einfache Streckung des Zentriols, ohne Bildung einer achromatischen Spindel, zu Stande kam. Es würde hier das Basalkörperchen, das weitere Teilungen einging, in der Wand der Kernmembran, von welcher die Geissel entspringt, eingeschlossen und der in der Kernsaftzone liegende Rhizoplast wurde resorbiert, wie HARTMANN und CHAGAS bei *Prowazekia cruzi* konstatierten.

Die nach GIEMSA gefärbten Trockenpräparate zeigen nur die, bei den grossen länglichen Formen angeführten, Einzelheiten (Fig. 30 und 31, Tafel 8). Man

se entretanto dois aspetos bem distintos do plasma : disposição fibrilar muito nitida em alguns individuos (fig. 30, est. 8) e em outros aspeto alveolar (fig. 31, est. 8). Não podemos dizer, si se trata aqui de defeito da fixação ou de característica real.

b) *Formas arredondadas.*

São provenientes das formas precedentes, pela perda do flajelo e arredondamento do plasma. Vimos muitas vezes estádios intermediarios entre estas e aquellas, e, como estes aspetos intermediarios são mais instrutivos vistos a fresco que em preparações córadas, passamos a referir como as *grandes formas longas* tornam-se *arredondadas*.

Depois de destacado o flajelo, o endoplasma contráe-se em sentido longitudinal, alargando-se no transversal, até que os dois diâmetros se tornam aproximadamente iguais. Isto dá em resultado a formação duma lente biconvexa, arredondada, envolvida exteriormente pelo periplasto que acompanhou as retrações do plasma interno.

A membrana ondulante, contendo abundantes fibrilas, fica situada nas bordas da figura e, devido á sua pouca consistencia, curva-se sobre uma das faces desta, formando uma grande dobra. Outras vezes o parazito parece sofrer distorsão em sentido longitudinal, e, dobrando-se ao meio, as duas metades da face oposta á membrana ondulante vêm fundir-se uma á outra, ficando com uma forma mais alongada que no cazo precedente. Efetuado o arredondamento por este ultimo processo, a membrana ondulante acha-se em ambas as bordas estendida sobre uma das faces da célula, formando duas dobras. As figs. 5 e 12, est. 7, mostram até certo ponto os processos referidos.

Nas preparações córadas, estas formas arredondadas apresentam, em virtude de sua pouca consistencia e da distensão do

bemerkt jedoch beim Plasma zwei sichtlich verschiedene Strukturbilder, eine deutlich fibrilläre Anordnung bei einigen Individuen (Fig. 30, Tafel 8), bei andern ein wabiges Aussehen (Fig. 31). Ich lasse es unentschieden, ob es sich um eine mangelhafte Fixierung oder um ein gutes Kennzeichen handelt.

b) *Rundliche Formen.*

Diese Formen gehen durch Verlust der Geissel und Abrundung des Plasmas aus den zuletzt beschriebenen hervor. Ich sah sehr häufig Uebergangsstadien zwischen jenen und diesen und da solche Zwischenstufen lehrreicher sind, wenn sie an frischem Materiale, im Gegensatze zu gefärbten Präparaten, beobachtet werden, so gehe ich zur Schilderung über, wie sich die grossen länglichen Formen abrunden.

Nach Verlust der Geissel kontrahiert sich das Endoplasma in der Längsrichtung unter Verbreiterung des Querdurchmessers, bis beide Axen ungefähr gleich lang sind. Es entsteht so eine rundliche biconvexe Linse, die nach aussen vom Periplast eingehüllt ist, welcher die Umformung des Innenplasmas begleitet.

Die undulierende Membran, welche reichlich Fibrillen enthält, bleibt am Rande des Körpers und legt sich, in Folge ihrer Konsistenz, unter Bildung einer grossen Falte über eine seiner Flächen. Andere Male scheint sie in der Längsrichtung verzogen zu werden und erscheint dann länger als im vorigen Falle, indem sich die ihr gegenüberliegende Seite in der Mitte faltet und die zur Berührung kommenden Flächen verschmelzen. Findet die Abrundung auf diese Weise statt, so erscheint die undulierende Membran an beiden Rändern und verläuft unter Bildung zweier Falten über eine der Zellflächen. Die beschriebenen Vorgänge sind auf den Fig. 5—12 wenigstens teilweise zu erkennen.

In gefärbten Präparaten zeigen solche abgerundete Formen, wegen ihrer geringen Konsistenz und in Folge des

sangue sobre as laminulas, variadas pregas, ficando ás vezes o parasito dobrado aproximadamente ao meio (figs. 7 e 24, est. 8).

Pelo metodo de GIEMSA, a seco, estas formas não apresentam tais dobras, aparecendo o plasma côrado homojeneamente em azul. Ellas constituem o tipo esferico de LAVERAN e MESNIL (1904).

Nestas formas, o blefaroplasto vai se aproximando aos poucos do nucleo principal, até ficar aderente á sua membrana. O trofonucleo oferece, a principio, a mesma estrutura do das *grandes formas longas* (fig. 5, est. 7), isto é, um cariozoma muito volumoso, em cujo centro é visto (em preparações bem diferenciadas), o centriolo, e para fóra uma zona de suco nuclear e a membrana nuclear. Deve se notar que nunca foi observada camada abundante de linina junta á face interna da membrana do nucleo.

O cariozoma em seguida se intumece, quasi toda a cromatina é dissolvida, ficando apenas o centriolo, envolvido de pequena quantidade della (figs. 6, 7 e 8, est. 7), imerso em rede finamente alveolar que apresenta aproximadamente a mesma coloração do plasma, e possui, algumas vezes, pequenas granulações de cromatina (fig. 7, est. 7). Este esvaziamento do cariozoma em sua cromatina mostra realizar-se aqui o mesmo fenomeno já referido acima, das *pulsações ciclicas*. Si não são encontrados cromidios no plasma, tanto nestas como nas formas precedentes, é porque a cromatina passa para elle em estado de dissolução, como pensa HARTMANN (1910) para um cazo particular da *Entamoeba testudinis*.

Quando o cariozoma se acha assim *esvaziado* é que o blefaroplasto, então aderente á face externa da membrana, entra no nucleo (figs. 6, 7 e 8, est. 7). Parece ser só o cariozoma do blefaroplasto que penetra nelle, por perfuração da membrana, como é bem evidente nas mesmas

Ausstreichens, verschiedene Falten, wobei der Parasit manchmal annähernd in der Mitte zusammengelegt erscheint (Fig. 6 und 31). Bei der trockenen Methode von GIEMSA zeigen diese Formen keine solchen Falten und das Plasma erscheint gleichmässig blau gefärbt. Sie repräsentieren LAVERAN und MESNIL's sphärischen Typus (1904).

Bei diesen Formen nähert sich der Blepharoplast nach und nach dem Hauptkerne, bis er seiner Membran adhärirt. Der Trophonukleus zeigt anfangs dieselbe Struktur, wie bei den grossen länglichen Formen (Fig. 5), nämlich ein sehr grosses Karyosom, welches in gut differenzierten Präparaten ein Zentriol und, nach aussen, eine Kernsaftzone und eine Kernmembran zeigt. Es ist bemerkenswert, dass niemals eine reichliche Lininschicht nahe der Innenfläche der Kernmembran gefunden wurde.

Hierauf bläht sich das Karyosom, während sich fast das ganze Chromatin auflöst und nur ein kleiner Teil um das Zentriol erhalten bleibt (Fig. 6, 7 und 8). Letzteres ist umgeben von einem sehr feinwabigen Netz, welches annähernd dieselbe Färbung, wie das Plasma, zeigt und manchmal kleine Chromatinkörnchen aufweist (Fig. 7). Dieses Verschwinden des Chromatins aus dem Karyosom zeigt, dass auch hier die, schon oben erwähnte, Erscheinung der zyklischen Pulsationen stattfindet. Wenn in dieser und den vorhergehenden Formen im Plasma keine Chromidien gefunden werden, so rührt dies daher, dass das Chromatin in gelöstem Zustand in dasselbe übertritt, wie HARTMANN (1910) für den speziellen Fall der *Entamoeba testudinis* annimmt.

Nachdem das Karyosom auf diese Weise leer geworden, tritt der bisher mit der Aussenfläche der Membran verklebte Blepharoplast in den Kern ein (Fig. 6, 7 und 8). Es scheint, dass nur das Karyosom des Blepharoplasts nach Durchbohrung der Kernmembran eindringt, wie aus den angeführten Figuren deutlich zu ersehen ist. Nach seinem Eintritte ver-

figuras acima. Depois da sua penetração, elle permanece algum tempo na zona de suco nuclear (fig. 7, est. 7) e em seguida na massa alveolar de linina (restos do antigo cariozoma). A esse tempo começa efetuar-se a rejeneração do cariozoma do nucleo principal, aumentando gradativamente de volume (figs. 7, 11, est. 7).

Deste periodo em diante começam estádios interessantes que se ligam á multiplicação do tripanozomo, traduzindo-se por divizões do centriolo e cariozoma.

No interior da membrana nuclear o cariozoma divide-se por estiramento multiplicas vezes, dando em resultado pequenos cariozomas, ligados uns aos outros, quazi sempre, por uma fibrila cromatica. Estas fibrilas denotam, provavelmente, divizões intranucleares do centriolo (figs. 9 e 10, est. 7). Outras vezes os cariozomas secundarios não perzistem no interior da membrana. Então o primitivo adquire maior volume que de ordinario (compare-se figs. 11 e 12, est. 7), e em torno delle forma-se uma nova membrana que o izóla da linina que constituiu a armação do antigo cariozoma. Esta linina, na fig. 12, est. 7, é vista sob forma de crescente em cuja concavidade está a membrana de nova formação. Como já foi dito, esta parece ser realmente uma membrana, e não condensação das fibrilas de linina, simulando este aspecto. O fato de (na fig. 12, est. 7) o cariozoma filho atravessal-a sem deixar vestijio aparente de sua passagem, rezulta de ser ella ainda muito delgada, de paredes pouco rezistentes. Além disto, estes aspetos, vistos a fresco, apresentam-se como duas veziculas refrinjentes, uma dentro da outra.

Nestas figuras o cariozoma vai expulsando, sucessivamente, para o plasma granuloso volumozos de cromatina. Estes, depois de destacados, fazem pressão na face interior da membrana nuclear, formando pequena hernia, pelo distendimento desta membrana.

Esta hernia que vai, aos poucos, se estrangulando, é constituida por uma

weilt es einige Zeit in der Kernsaftzone (Fig. 7) und darauf in der wabigen Lininmasse, dem Reste des ursprünglichen Karyosoms. Jetzt beginnt die Regeneration des Karyosomes des Hauptkernes, welches allmählich anschwillt (Fig. 7, 11). Von jetzt an erfolgen interessante Veränderungen, welche mit der Vermehrung der Trypanosomen in Verbindung stehen und sich durch Teilung von Zentriol und Karyosom äussern.

Im Innern der Kernmembran teilt sich das Karyosom vielfach durch einfache Streckung, wobei kleine Karyosomen entstehen, die fast immer durch eine Chromatinfaser mit einander verbunden sind. Letztere deuten mit Wahrscheinlichkeit auf intranukleäre Zentriolteilungen hin. (Fig. 9 und 10).

In andern Fällen findet keine Permanenz sekundärer Karyosome im Innern der Membran statt. In diesem Falle nimmt das Karyosom eine bedeutendere Grösse an, als sie sonst beobachtet wird, (vergl. Fig. 11 und 12) und erhält eine neue Membran, welche es von dem Linin trennt, welches das Gerüst des früheren Karyosomes bildete. Dieses Linin erscheint in Fig. 12 als ein Halbmond, in dessen Konkavität die neugebildete Membran liegt. Wie schon gesagt, scheint es sich um eine wirkliche Membran zu handeln, nicht bloss um eine Verdichtung von Lininfibrillen, welche diesen Anschein erweckt. Die Möglichkeit, dass das Tochterkaryosom dieselbe durchsetzen kann, ohne scheinbar eine Spur seines Durchtrittes zu hinterlassen, wird dadurch gegeben, dass die Membran noch sehr dünn ist und wenig widerstandsfähige Wände hat.

Ueberdies erscheinen diese Bilder in frischem Zustande als zwei lichtbrechende Bläschen, von denen das eine im andern liegt.

Auf diesen Figuren lässt das Karyosom sukzessive grosse Chromatinkörner ins Plasma austreten. Diese üben auf die Innenseite der Kernmembran einen Druck aus und bilden durch Dehnung derselben

membrana, uma zona clara, um corpusculo de cromatina, o qual na fig. 12, est. 7, ainda está prezo ao cariozoma por um filamento cromático. Com tal estrutura, esta formação é evidentemente um nucleo filho. E' interessante, nestes cazos, o modo de constituir-se a membrana nuclear, que se origina directamente da do nucleo mais antigo.

Assim se formam os pequenos nucleos que ficam, espalhados no plasma do parazito (fig. 13, est. 7).

Aí, ainda se dividem; uns por processo semelhante ao inicial (como se vê na parte inferior, á esquerda, fig. 13), outros por divizão homopolar do cariozoma (como se nota na parte superior e mediana da mesma figura); outros ainda, *formam precocemente o blefaroplasto*, por estiramento do centriolo, envolvido de pequena quantidade de cromatina (mesma figura). A referida figura mostra ainda, na parte central, o nucleo primitivo, cujo cariozoma possui certa riqueza cromática, o que indica continuação do processo de multiplicação. Terminado este, elle fica, algumas vezes, sob forma de nucleo residual, numa zona excentrica do plasma (fig. 36, est. 8).

Quando o cariozoma destas formas se divide multiplas vezes dentro da membrana nuclear (figs. 9 e 10, est. 7) os cariozomas recémformados passam, provavelmente por dissolução do nucleo, duma só vez para o plasma.

Nestas condições, a membrana dos novos nucleos será formada a custa do proprio cariozoma, e não, como no primeiro cazo, oriunda directamente da membrana do nucleo primitivo.

Em qualquer das condições referidas, os nucleos filhos, uma vez expulsos, tornam-se o centro enerjetico de determinada zona de plasma que se condensa em torno de cada um delles, constituindo assim pequenas celulas (figs. 14, 15 e 16, est. 7).

A condensação do plasma traz como consequencia diminuição do volume das *formas arredondadas* como se verá pela comparação das figs. 5 e 16, est. 7.

kleine Hernien, die sich allmählich abschnüren. Sie bestehen aus einer Membran, einer hellen Zone und einem Chromatinkorn, welches in Fig. 12 noch durch einen Chromatinfaden mit dem Karyosom verbunden ist. Nach diesem Bau zu schliessen, handelt es sich zweifellos um einen Tochterkern. Die Art, wie sich in diesem Falle die Membran direkt aus derjenigen des Mutterkernes bildet, ist sehr interessant.

Auf solche Weise entstehen kleine, im Plasma des Parasiten zerstreute Kerne, die sich noch weiter teilen (Fig. 13, Tafel 7). Bei den einen geschieht dies durch einen dem ursprünglichen ähnlichen Prozess (S. Fig. 13 unten links), bei anderen durch eine homopolare Teilung des Karyosoms (Fig. 13 oben und in der Mitte); noch andere bilden frühzeitig einen Blepharoplasten, indem sich das, von einer geringen Chromatinmenge umgebene, Centriol in die Länge zieht, wie in derselben Figur zu sehen ist. Ausserdem zeigt diese in der Mitte den Primärkern mit einem an Chromatin ziemlich reichen Karyosom, was ein Fortdauern des Teilungsprozesses andeutet. Nach Vollendung desselben findet er sich manchmal als Residualkern in einer vom Zentrum entfernten Plasmazone (S. Fig. 36, Taf. 8).

Wenn sich bei diesen Formen das Karyosom wiederholt innerhalb der Kernmembran teilt (Fig. 9 und 10), so treten die neugebildeten Karyosomen gleichzeitig ins Plasma über, wohl in Folge einer Auflösung des Kernes. In diesem Falle wird die Membran der neuen Kerne direkt vom Karyosom gebildet und nicht, wie oben beschrieben, auf Kosten der Membran des Mutterkernes.

In beiden Fällen bilden die Tochterkerne nach ihrem Austritt das Energiezentrum einer bestimmten Plasmazone, welche sich um sie verdichtet und so kleine Zellen bildet (Figs. 14—16). Die Kondensation des Plasmas führt zu einer Volumsabnahme der abgerundeten Formen, wie man aus der Vergleichung der Fig. 5—16 sieht.

O periplasto dá a impressão de membrana frouxa, imperfeita e que se destaca muitas vezes, dando o aspeto das figs. 26, est. 7 e 37 e 39, est. 8.

As células filhas, resultantes da divisão múltipla do tripanozomo, aparecem muito variáveis em dimensões como em numero. Aproximadamente esféricas, ellas apresentam quasi sempre o nucleo situado excentricamente num dos polos. Elle tem aspeto igual ao dos nucleos de algumas formas jovens de tripanozomos: A membrana, zona de suco nuclear e grande cariozoma em cujo centro se vê, ás vezes, o centriolo. São vistas trabeculas de linina partindo do cariozoma e prendendo-se á face da membrana, havendo, algumas vezes, neste ponto de inserção, granulos de cromatina.

Raramente existe um granulo de cromatina ligado ao cariozoma (figs. 15 e 18, est. 7) que é, sem duvida, o blefaroplasto ainda aderente.

O plasma, de estrutura alveolar, dispõe-se sob o aspeto de crescente, cuja concavidade está voltada para o nucleo (mesmas figuras).

Estas células filhas acham-se espalhadas no endoplasma condensado, e são lançadas na circulação por destacamento ou ruptura do periplasto, (fig. 16, est. 7 e 39, est. 8). O numero dellas variou, nas observações, de 5 a 17 unidades (figs. 18, est. 7 e 38, est. 8). Suas dimensões, como dissemos, são tambem muito variáveis. As mais volumozas, depois de livres na circulação crecem até certo ponto e sofrem novas divisões por processo analogo, dando em resultado os aspetos observados nas figs. 17 e 19, est. 7 e 40, est. 8; o numero de unidades assim formadas, varia de 2 a 4, sendo mais comum o de trez. Ellas formam depois o aparelho flajelar pelo processo já referido (fig. 20, est. 7), constituindo os organismos que vão ser descritos abaixo.

Der Periplast erweckt den Eindruck einer losen und schlecht ausgebildeten Membran, welche sich öfters ablöst, wobei dann Bilder wie auf den Figuren 26, 37 und 38 entstehen.

Die Tochterzellen, welche bei der multipeln Teilung des Trypanosomas entstehen, zeigen sehr verschiedene Grösse und Zahl. Sie sind annähernd rund und ihr Kern liegt fast immer excentrisch in der Nähe eines der Pole. Er gleicht den Kernen mancher Jugendformen von Trypanosomen und zeigt ein grosses Karyosom, in dessen Zentrum manchmal ein Zentriol. eine Kernsaftzone und eine Membran sichtbar sind. Man sieht auch vom Karyosom ausgehende und sich an der Innenseite der Membran anheftende Lininfäden, die manchmal am Anheftungspunkte Chromatinkörner zeigen.

Selten findet sich ein mit dem Karyosom verbundenes Chromatinkorn, wie in Fig. 15 und 18, welches zweifellos der noch adhärente Blepharoplast ist.

Das wabig aussehende Plasma zeigt die Form eines Halbmondes, dessen Konkavität dem Kerne zugewandt ist. (S. die nämlichen Figuren).

Diese Tochterzellen liegen im verdichteten Plasma zerstreut und treten durch Ruptur des Periplasts in den Blutstrom über (Fig. 18, Taf. 7 und Fig. 38, Taf. 8). Ihre Zahl schwankte in den Beobachtungen zwischen 5 und 17 und auch ihre Grösse ist, wie oben gesagt, eine sehr verschiedene. Die grössten wachsen, auch nachdem sie in die Zirkulation gelangten, noch bis zu einem gewissen Grade und teilen sich in derselben Weise weiter, so dass Bilder entstehen, wie sie die Fig. 17, 19 und 40 zeigen; die so entstandenen Teilindividuen wechseln zwischen zwei und vier, wobei die Zahl drei am häufigsten vorkömmt. Sie bilden dann auf die bereits beschriebene Weise den Geisselapparat (Fig. 20), wodurch die gleich zu beschreibenden Formen zu Stande kommen.

c) *Pequenas formas longas :*

Provenientes das unidades descritas, estes pequenos tripanozomos apresentam dualidade morfica bem acentuada. Uns oferecem o nucleo alongado tendo em seu interior um cariozoma bastante volumoso limitado nitidamente pela zona de suco nuclear. Serão tais aspetos devidos ás variações ciclicas já referidas? E' provavel que estes elementos sejam dotados tambem desta faculdade, principalmente os representados pela fig. 22, Est. 7 ; mas a auzencia, em uma das formas (fig. 23, est. 7), da zona de suco nuclear, com o cariozoma menor imerso numa rede de linina, é muito constante, pelo que julgamos serem ellas duas celulas realmente distintas.

Em ambas estas formas, os outros componentes são mais ou menos iguais, contando-se apenas, comumente, estrutura alveolar mais grosseira do endoplasma naquellas que apresentam nucleo menos cromatico (comparem-se as 2 figs. 22 e 23, est. 7).

CONSIDERAÇÕES SOBRE AS TREZ FORMAS DESCRITAS.

Os aspetos até agora observados, existem, com muito maior frequencia, nas rãs infetadas recentemente, tornando-se raras, e até desaparecendo, nas de infeções antigas.

O criterio adotado aqui, para classificar as infeções em *antigas* e *recentes*, (desde que nunca obtivemos infeções artificiais) funda-se naturalmente em que, em dada zona, donde procedia nosso material, sendo quazi a totalidade das rãs infetadas, é claro que as mais novas apresentam infeções mais recentes que as mais velhas.

As *formas arredondadas*, em periodos de multiplicação encontram-se no sangue periferico, mas são mais abundantes na

c) *Kleine längliche Formen.*

Diese kleinen Trypanosomen, welche auf die soeben beschriebene Weise entstehen, zeigen zwei deutlich verschiedene Formen. Die einen haben eine länglichen Kern, der ein kleines, in einem Liniengerüste liegendes Karyosom enthält (Fig. 23); auch die andern haben einen länglichen Kern, der aber in seinem Innern ein ziemlich grosses Karyosom zeigt, welches durch die Kernsaftzone deutlich begrenzt erscheint. Sind diese verschiedenen Bilder durch die schon erwähnten zyklischen Veränderungen zu erklären? Es ist wohl wahrscheinlich, dass auch diese Formen dieselbe Funktion besitzen, namentlich die in Fig 22 dargestellten, aber das Fehlen der Kernsaftzone und das kleine Karyosom im Innern eines Liniengerüsts ist bei der ersten Form (Fig. 23) ein so konstantes, dass ich sie für zwei ihre Natur nach verschiedene Zellen halte.

Die anderen Komponenten sind bei beiden Formen so ziemlich gleich, nur zeigen diejenigen mit dem chromatinärmeren Kerne gewöhnlich eine gröbere wabige Struktur (vergl. die Fig. 22 und 23).

BETRACHTUNGEN UEBER DIE DREI BESCHRIEBENEN FORMEN.

Die drei beobachteten Formen finden sich bei frisch infizierten Fröschen weit häufiger und werden bei denen mit älterer Infektion seltener oder verschwinden ganz. Das Kriterium für die Unterscheidung frischer und älterer Infektionen stützt sich, da ich, wie gesagt, keine künstliche Infektion erzielte, darauf, dass in der Zone, aus welcher fast mein gesamtes Material stammte, beinahe sämtliche Frösche infiziert waren, so dass natürlicherweise bei den jüngeren die Infektion neueren Datums sein musste, als bei den älteren.

Die runden, in Teilung begriffenen Formen finden sich im peripherischen Blute, sind aber in den Blutgefäßen der inneren Organe weit häufiger, so dass sie

circulação viceral, fujindo assim, em grande parte, daquella para esta.

Acreditamos haver certa preferencia do parasito para o figado e, principalmente para os rins, sendo aí a sede de sua maior frequencia.

Nas outras vicerias, exeção feita do baço, onde é visto poucas vezes, não pudemos verificar sua presença. Estas formas não penetram na espessura dos tecidos; permanecem na rede vascular, onde, parece-nos, ficam aderentes ao endotelio dos pequenos vazos.

Os estádios que reveste o nucleo, nos degraus sucessivos de seu processo de multiplicação, são originaes para os tripanozomos, mas assemelham-se aos de certos protozoários, coccidios e, principalmente, heliozarios e radiolarios, que serviram de base a HARTMANN (1909) para estabelecer a *teoria dos nucleos polienergeticos (Polyenergide Kern)*.

As pesquisas de ZUELZER (1909) na *Wagnerella borealis*, de JOLLOS (1909) na *Adelea ovata*, de BORGERT (1909) na *Aulacantha scolymantha*, de HARTMANN (1910) na *Trichonympha hertwigi*, e de CHAGAS (1910) em *Adelea hartmanni* — mostrando a formação de multiplos cariozomas dentro da membrana nuclear, os quaes uma vez que sejam expulsos para o plasma, irão constituir nucleos de celulas filhas, — constituem o fato que, na citologia dos protozoários, mais se aproxima do caso por nós observado. Por isso, julgamos ficar bem estabelecida a *polienergia* para o nucleo destas formas do *Trypanosoma rotatorium*.

Sobre a multiplicação deste tripanozomo existem as pesquisas de DANILEWSKY (1889) referidas por FRANÇA e ATHIAS (1907) e as de DUTTON e TODD (1907).

A tecnica de que se serviram estes autores para surpreender os estádios de divizão do parasito, consiste em retirar aseticamente o sangue do coração e observá-lo, entre lamina e laminula ou em camara

grossenteils das erstere verlassen müssen, um letztere aufzusuchen.

Ich glaube, dass der Parasit eine Vorliebe für die Leber und besonders für die Nieren hat, da er daselbst am häufigsten gefunden wird.

In den anderen innern Organen konnte ich denselben nicht nachweisen, von der Milz abgesehen, wo er einige Male gefunden wurde. Diese Formen dringen nicht in das Gewebe selbst ein, sondern bleiben im Gefässnetz, wo sie, wie mir scheinen will, dem Endothel der kleinen Gefässe anhaften.

Die Zustände, welche der Kern in den sukzessiven Stadien des Teilungsprozesses aufweist, sind den Trypanosomen eigentümlich, ähneln aber denjenigen anderer Protozoen, wie Kokzidien und besonders Heliozoen und Radiolarien, auf welche HARTMANN die, von ihm aufgestellte, Theorie der polyenergiden Kerne basierte. Die von ZUELZER (1908) an *Wagnerella borealis*, von JOLLOS bei *Adelea ovata*, (1909) und BORGERT an *Aulacantha scolymantha*, von HARTMANN (1910) an *Trichonympha hertwigi* und von CHAGAS (1910) an *Adelea hartmanni* gemachten Untersuchungen zeigten die Bildung zahlreicher Karyosomen innerhalb der Kernmembran, welche, nach ihrem Austritt ins Plasma, Kerne von Tochterzellen bilden und repräsentieren in der Zytologie der Protozoen Beobachtungen, welche dem von mir beobachteten Falle am nächsten stehen. Ich halte deshalb die *Polyenergie* der Kerne dieser Formen des *Trypanosoma rotatorium* für erwiesen.

Ueber die Vermehrung dieses Trypanosomas giebt es, ausser den Untersuchungen von DANILEWSKY (1889), die 1907 von FRANÇA und ATHIAS referiert wurden, noch solche von DUTTON und TODD (1907).

Die Technik, welche diese Autoren anwandten, um die Teilungsstadien zu verfolgen, besteht darin, das Herzblut aseptisch zu entnehmen und, im Deckglaspräparat oder in der feuchten Kammer, während Stunden und Tagen mikro-

humida, ao microscopio, durante horas ou dias seguidos. Em momentos diversos, quando julgavam conveniente, faziam com este sangue preparações côradas, com o fim de conhecerem a morfologia dos varios estádios.

Utilizando-se desta tecnica foi que descreveram o processo multiplicativo do parasito.

Os resultados que obtiveram diferem totalmente dos que descrevemos atraz.

Elles falam de divizão multipla em que as formas redondas se dividiram em duas, estas em quatro, e assim por diante, até um numero muito elevado de unidades, calculado em 64 por DUTTON e TODD e em 120 por DANILEWSKY.

Como se vê facilmente, pela descrição dos autores, tal processo não constitue divizão multipla do tripanozomo, mas somente divizão binaria, rapida, *acompanhada de fissura do plasma*.

Este processo não se realiza no sangue do vertebrado, para qualquer que seja a forma do parasito. As referidas pesquisas não foram realizadas nas condições naturais de vida do protozoario, mas em condições artificiais, analogas aos meios de cultura.

Com qualquer tripanozomo cultivavel é possivel obter resultados semelhantes aos de DANILEWSKY e de DUTTON e TODD, desde que elle seja observado pela mesma maneira.

Mesmo no interior de hematofagos, notam-se estádios puramente vejetativos, de diversos tripanozomidas analogos aos aspetos descritos para o *Trypanozoma rotatorium* pelos autores acima.

Seria bastante saber-se o resultado final de tais divizões, dando orijem ao aparecimento de critidias, para concluir-se que este não poderia ser o processo natural, pois nenhum tripanozomida apresenta aspetos critidiformes no sangue do vertebrado.

Existem duas opiniões sobre o papel do blefaroplasto na biologia dos tripano-

skopisch zu beobachten. In verschiedenen, angemessenen Zeiträumen machten sie mit diesem Blute gefärbte Präparate, um die Morphologie der verschiedenen Stadien zu studieren. Nach den mit diesem Verfahren gemachten Beobachtungen beschrieben sie den Vermehrungsprozess der Parasiten; dabei erwähnen sie eine multiple Teilung, bei welcher die runden Formen in 2, 4 etc. bis zu einer sehr grossen Zahl von Individuen zerfallen, die von DUTTON und TODD auf 64, von DANIELSEN auf 120 geschätzt werden.

Das Resultat ihrer Beobachtungen ist von dem, welches ich oben beschrieb, völlig verschieden.

Wie man aus der Darstellung dieser Prozess nicht eine multiple Teilung des Trypanosomas dar, sondern eine binäre, *bei der auch das Plasma in zwei Teile zerfällt*.

Dieser Prozess vollzieht sich niemals im Blute der Wirbeltiere, um welche Form des Parasiten es sich auch handeln möge. Die Untersuchungen wurden eben nicht unter den natürlichen Lebensbedingungen der Protozoen angestellt, sondern unter künstlichen, denjenigen in Kulturmedien entsprechenden.

Aehnliche Resultate, wie die von DANILEWSKY, sowie von DUTTON und TODD, kann man bei jedem kultivierbaren Trypanosoma erhalten, sobald es in derselben Weise beobachtet wird. Auch im Innern von blutsaugenden Schmarotzern beobachtet man rein vegetative Stadien, welche den von jenen Autoren bei *Trypanosoma rotatorium* beobachteten entsprechen.

Die Kenntnis des Endresultates dieser Teilung, welche zur Bildung von Krithidien führt, würde genügen, um anzunehmen, dass dies nicht der natürliche Vorgang sein könne, da keine Trypanosomiden im Blute der Wirbeltiere krithidienartige Formen zeigen.

Ueber die Rolle des Blepharoplasts in der Biologie der Trypanosomiden giebt es zwei Meinungen, die zu erwähnen hier am Platze scheint. Eine derselben schreibt ihm die Funktion eines Zentrosomes bei

zomidas que, por oportunas, devem aqui ser referidas. Uma dellas atribue ao blefaroplasto a função de centrozoma nas cinezes do nucleo, a outra se refere a uma autogamia que seria realizada pela fuzão do mesmo blefaroplasto ao nucleo principal.

A primeira dellas foi relembrada ainda em 1907 por FRANÇA e ATHIAS, que se mostraram partidarios de tal idea, ao observarem no *Trypanosoma rotatorium* a penetração do cineto- no trofonucleo.

As aquisições em citologia dos protozoarios são hoje de tal ordem que deixariamos de discutir esta opinião, si sobre ella não se tivessem manifestado os distintos pesquisadores do *Instituto Camara Pestana*.

HARTMANN e v. PROWAZEK (1907) demonstraram o papel predominante que desempenha o centriolo dos protozoarios nas cinezes do nucleo, fornecendo uma das razões preponderantes para estabelecerem estreita homologia entre o cariozoma delles e o centrozoma dos metazoarios. Pois, como é sabido pelas verificações de BOVERI (1900), confirmadas por outros autores, o centrozoma possui, além das esferas atrativas e centroplasma, um centriolo, que é o seu elemento principal e cuja divizão dá inicio á cariocineze.

Pesquisas posteriores de HARTMANN (1908, 09 e 10), HARTMANN e v. PROWAZEK (1907), HARTMANN e NAEGLER (1909), NAEGLER (1909), ARAGÃO (1909), CHATTON (1910), ZUELZER (1909), CHAGAS (1910-1911), JOLLOS (1909-10), BOTT (1907), KEYSSELITZ (1908), e outros observadores vieram demonstrar a existencia e o papel do centriolo nas divizões nucleares em grande numero de amebas, em heliozoarios, coccidios, mixosporidios, dinoflagelados e até em infuzorios. Nos flajelados SCHAUDINN (1904) e v. PROWAZEK (1904) já notaram sua presença e as pesquisas de BERLINER (1909), ROSENBUSCH (1908), CHAGAS (1909), HARTMANN

der Kinese des Kernes zu; die andere bezieht sich auf eine Autogamie, welche durch die Verschmelzung desselben mit dem Hauptkerne zu Stande kommen soll.

Die erste derselben wurde 1907 wieder von FRANÇA und ATHIAS angeführt, welche sich als Anhänger dieser Idee zeigten, weil sie bei *Trypanosoma rotatorium* das Eindringen des Kinetonukleus in den Hauptkern beobachteten.

Die Kenntnisse in der Zytologie der Protozoen sind heutzutage derart vorgeschritten, dass ich eine Diskussion dieser Ansicht unterlassen könnte, wenn sich die hervorragenden Forscher des *Institutes Camara Pestana* nicht darüber geäußert hätten.

HARTMANN und v. PROWAZEK zeigten 1907 die hervorragende Rolle, welche das Zentriol der Protozoen bei den Karyokinesen übernimmt und gaben damit einen Hauptgrund für die Aufstellung einer weitgehenden Homologie zwischen ihrem Karyosom und dem Zentrosom der Metazoen. Wie von BOVERI 1900 festgestellt und von anderen Autoren bestätigt wurde, besitzt ja das Zentrosom neben den Attraktions-sphären und dem Zentroplasma noch ein Zentriol, welches das Hauptelement darstellt und durch seine Teilung die Karyokinese einleitet.

Spätere Untersuchungen von HARTMANN (1908-1910), HARTMANN und v. PROWAZEK (1907), HARTMANN und NAEGLER (1909), ARAGÃO (1909), CHATTON (1910), ZUELZER (1909), CHAGAS (1910-1911), JOLLOS (1909-1910), BOTT (1908), KEYSSELITZ (1908) und noch anderen Beobachtern erwiesen das Vorkommen des Zentriols und seine wichtige Rolle bei der Kernteilung für zahlreiche Amöben, sowie für Heliozoen. Kokzidien, Myxosporidien, Dinoflagellaten und sogar für Infusorien. Bei den Flagellaten beobachteten schon SCHAUDINN (1904) und v. PROWAZEK (1904) sein Vorkommen, welches durch die Untersuchungen von BERLINER (1909), ROSENBUSCH (1908), CHAGAS (1909), HARTMANN und CHAGAS (1909), HARTMANN und CHAGAS (1910),

e CHAGAS (1910), ARAGÃO (1910), JOLLOS (1910) e NAEGLER (1910) vieram confirmar de modo seguro.

Por outro lado, as celebres pesquisas de SCHAUDINN (1904) sobre a formação do aparelho flajelar no *oocinet* do *Hemoproteus noctuae*, demonstraram que o nucleo principal dá origem, por divisão hetero-polar, ao blefaroplasto. Atualmente é sabido que este possui todos os elementos do trofonucleo: membrana, zona de suco nuclear, cariozoma e centriolo (ROSENBUSCH e CHAGAS).

Elle é, portanto, um nucleo autonomo, independente, porque possui um centriolo, o qual provem do centriolo do nucleo principal. As mitoses que o blefaroplasto experimenta, semelhantes ás do trofonucleo, põem bem em evidencia a existencia de tal elemento no seu interior, como verificaram ROSENBUSCH, HARTMANN e CHAGAS.

Pelo que se vê, o blefaroplasto poderia ser considerado *centrozoma* no caso particular do *Trypanosoma rotatorium* si, por ocasião de sua formação, todo o centriolo do trofonucleo passasse para o interior delle. O cariozoma do nucleo principal ficaria então um nucleolo (no sentido de HARTMANN).

E' verdade que o centriolo pode existir fóra do primitivo cariozoma, como provam as verificações de SCHAUDINN (1896) no *Acanthocystis*, de KEYSSELITZ (1908) no *Myxobolus pfeifferi*, de BOTT (1908) na *Pelomyxa palustris*, de HARTMANN e CHAGAS (trabalhos ineditos) em hemogregarinas. Este caso porém, não é applicavel aos *trypanosomidas*, mórmente ao *Trypanosoma rotatorium*, no qual o centriolo é claramente vizivel no cariozoma do nucleo principal.

Acrece ainda, aqui, a circumstancia de que nas *formas largas* (adiante descritas) deste parasito, as divisões binarias do nucleo principal e do blefaroplasto efetuam-se independentemente uma da outra (figs. 25, 26, est. 8).

Alem destas considerações, acreditamos que a fusão do blefaroplasto ao nucleo

ARAGÃO (1910), JOLLOS (1910) und NAEGLER (1910) vollständig bestätigt wurde.

Auf der anderen Seite zeigten die berühmten Studien von SCHAUDINN (1904) über die Entstehung des Geisselapparates beim Ookineten des *Haemoproteus noctuae*, dass der Hauptkern durch heteropolare Teilung den Blepharoplast erzeugt. Man weiss jetzt, dass dieser alle Elemente des Trophonukleus besitzt, also Membran, Kernsaftzone, Karyosom und Zentriol (ROSENBUSCH, CHAGAS). Derselbe ist also ein autonomer, unabhängiger Kern, weil er ein Zentriol besitzt, welches von demjenigen des Primitivkernes abstammt, und seine Mitosen, die denjenigen des Trophonukleus entsprechen, lassen das Vorkommen eines Zentralkornes in demselben deutlich erkennen, wie ROSENBUSCH, sowie HARTMANN und CHAGAS festgestellt haben.

Wie man sieht, könnte im speziellen Falle des *Trypanosoma rotatorium* der Blepharoplast als ein Zentrosom angesehen werden, wenn bei seiner Bildung das ganze Zentriol des Trophonukleus in denselben überginge. Das Karyosom des Hauptkernes wäre dann ein Nukleus im Sinne von HARTMANN.

Freilich kann das Zentriol ausserhalb des primitiven Karyosoms existieren, wie aus den Befunden von SCHAUDINN bei *Acanthocystis* (1896), von KEYSSELITZ bei *Myxobolus pfeifferi* (1908), von BOTT an *Pelomyxa palustris*, (1908), sowie aus unveröffentlichten Studien von HARTMANN und CHAGAS über Hämogregarinen hervorgeht. Doch lässt sich dieser Fall nicht auf das *Trypanosoma rotatorium* anwenden, da hier das Zentriol im Hauptkerne sehr deutlich sichtbar ist.

Es kommt hierzu noch der Umstand, dass bei den oben beschriebenen, breiten Formen dieses Parasiten die Zweiteilungen des Hauptkerns und Blepharoplasts unabhängig von einander vor sich gehen (Fig. 25 und 26, Tafel. 8).

Endlich bin ich der Ansicht, dass die Verschmelzung des Blepharoplasts mit dem

no *Trypanosoma rotatorium*, semelhante ao que se passa no *Schizotrypanum cruzi*, não é fato constante, como adiante se verá.

A' opinião de BREINL e MOORE (1907), referente a uma autogamia realizada no *Trypanosoma gambiense*, parece á primeira vista, que nossas pesquisas trazem certa confirmação.

Entretanto não podemos aceitar tal interpretação, porque é conhecido fato analogo ao deste parasito, muito bem observado por CHAGAS no *Schizotrypanum*, constando da fuzão que, ás vezes, se observa do blefaroplasto ao trofonucleo, logo antes de se efetuar a divisão nuclear. Não se pode considerar este ultimo caso como autogamia, porque o autor verificou diversas phases do ciclo sexuado do protozoario no hemiptero transmissor.

Nos protozoarios, em que seguramente existe a autogamia, os nucleos copulantes têm orijem, processos e aspetos inteiramente diversos dos que se verificam no *Trypanosoma rotatorium*.

A fuzão do blefaroplasto ao nucleo, constituindo processo analogo ao que se realiza no *Schizotrypanum*, consideramos como indicação do sexo do parasito, o que adiante explicaremos.

B) TIPO ASEXUADO.

c) *Formas largas.*

Ellas predominam nas infeções antigas (fig. 21, est. 7, figs. 25, 27, 32 e 35, est. 8).

Oferecem extrema variabilidade de dimensões e contorno, podendo-se dizer mesmo, não haver modalidade predominante. Entretanto, distinguem-se facilmente das formas acima descritas, qualquer que seja o seu volume. Nas preparações coradas pelo metodo de GIEMSA estes individuos apresentam o plasma grosseiramente alveolar, muitas vezes com gra-

Kerne des *Trypanosoma rotatorium*, ähnlich, wie bei *Schizotrypanum cruzi*, nicht konstant stattfindet, wie weiter unten begründet werden soll.

Auf den ersten Blick könnte es scheinen, dass meine Beobachtungen für die Anschauung von BREINL und MOORE (1907), betreffs der bei *Trypanosoma gambiense* stattfindenden Autogamie, eine Bestätigung bilden. Doch kann ich einer solchen Deutung nicht beipflichten, weil die Verschmelzung des Blepharoplasts mit dem Trophonukleus unmittelbar vor der Kernteilung, eine, ihrem Befunde entsprechende, bekannte und von CHAGAS bei *Schizotrypanum* genau beobachtete Tatsache ist. Dieser Fall kann aber nicht als Autogamie gedeutet werden, weil der Autor die Eigentümlichkeiten des sexuellen Zyklus im Ueberträger für diesen Protozoen festgestellt hat.

Bei den Protozoen, deren Autogamie unzweifelhaft ist, zeigen die kopulierenden Kerne sich nach Ursprung, Form und Verhalten ganz verschieden von denen, die man bei *Trypanosoma rotatorium* beobachtet.

Die Verschmelzung des Blepharoplasts mit dem Kerne entspricht einem bei *Schizotrypanum* vorkommenden Vorgange; ich betrachte dieselbe als Geschlechtscharakter, wie ich weiter unten erörtern werde.

B) GESCHLECHTSLOSER TYPUS.

c) *Breite Formen.*

Bei älteren Infektionen wiegen die breiteren Formen vor (Fig. 21, Taf. 7, Fig. 25, 27, 32, Taf. 8). Dieselben zeigen in Dimensionen und Umriss die grösste Verschiedenheit, so dass man sogar sagen kann, dass keine bestimmte Form vorwiegt. Immerhin unterscheiden sie sich unschwer von den vorher erwähnten Formen, welches auch ihre Grösse sei. In nach GIEMSA gefärbten Präparaten zeigen diese Formen ein grosswabiges Plasma, welches oft rotgefärbte Granulationen enthält, denen LEBEDEFF Chromatinnatur

nulações côradas em vermelho, as quais LEBEDEFF considera de natureza cromatica, pelo que as denominou *formas cromidiais*. Quando côradas pelo processo de ROSEN-BUSCH oferecem o seguinte aspeto: O endoplasma possui grossos alveolos; muitas vezes se vêem as granulações, acima referidas, côradas em escuro; o periplasto é pobre em fibrilas (figs. 21, est. 7, 26 e 27, est. 8).

O nucleo é de aspeto muito característico, servindo para a distinção destas formas das precedentes.

A's vezes mal se percebe uma tenue membrana nuclear (fig. 21, est. 7), outras vezes ella se torna mais vizível (fig. 26, est. 8).

No seu interior não se percebe a zona clara de suco nuclear; é todo occupado por uma trama de linina, geralmente de forma oval.

Nesta se encontra o cariozoma, communmente situado num dos polos (fig. 21, est. 7), como bloco compacto de cromatina, em cujo interior nunca poudeser visto o centriolo. A situação excentrica do cariozoma é que determina muitas vezes o aspeto alongado do nucleo, habitualmente observado nas colorações pelo GIEMSA (figs. 34 e 35, est. 8).

O blefaroplasto apresenta-se como um granulo escuro, alongado ás vezes, outras vezes esferico, envolvido dum halo claro.

Sua membrana não é apreciavel, dando a zona de suco nuclear a impressão dum vacuolo no plasma (fig. 21, est. 7, fig. 26, est. 8).

O flajelo parece quazi sempre partir do cariozoma do blefaroplasto e percorre a borda livre duma desenvolvida membrana ondulante, a qual é sempre mais larga e e com pregas mais acentuadas do que a das formas atraz referidas.

As *formas largas*, qualquer que seja o seu tamanho, sofrem divizões binarias, que dão outros tripanozomos. Portanto, ba-zeando-se no criterio de suas dimensões,

zuschrieb, weshalb er sie Chromidialformen nannte. Werden sie nach ROSEN-BUSCH gefärbt, so zeigen sie folgende Bilder: Das Endoplasma weist grosse Vakuolen auf, die oben erwähnten Körner zeigen oft eine dunkle Färbung und der Periplast ist arm an Fibrillen (Fig. 21, 25-26 und 28).

Der Kern hat ein sehr charakteristisches Aussehen, was zur Unterscheidung von den vorerwähnten Formen dient. Die Kernmembran ist oft dünn und schwer zu erkennen (Fig. 21, Taf. 7), andere Male ist sie deutlicher (Fig. 26, Taf. 8). Sein Inneres zeigt keine klare Kernsaftzone und wird ganz von einem, gewöhnlich ovalen, Lininnetz eingenommen. In diesem erscheint das Karyosom, gewöhnlich an einem der Pole gelegen, als ein kompakter Chromatinblock, der niemals im Innern ein Zentriol erkennen liess. Diese exzentrische Lagerung des Karyosoms bedingt oft die längliche Form des Kerns, die man gewöhnlich bei der GIEMSAfärbung beobachtet (Fig. 34 und 35, Taf. 8).

Der Blepharoplast erscheint als bald längliches, bald rundes, von einem hellen Hofe umgebenes Korn. Seine Membran ist nicht erkennbar und die Kernsaftzone macht den Eindruck einer Vakuole im Plasma (Fig. 21, Taf. 7, Fig. 26, Taf. 8).

Die Geissel scheint fast immer vom Karyosom des Blepharoplasts auszugehen und verläuft am freien Rande einer gut entwickelten undulierenden Membran, welche immer breiter und stärker gefaltet erscheint, als bei den früher erörterten Formen.

Die *breiten Formen* können, in jeder beliebigen Grösse, eine Zweiteilung eingehen, die neue Trypanosomen liefert. Man kann also die Dimensionen nicht zur Trennung von jungen und erwachsenen Formen verwenden. Grosse und kleine erscheinen gleichermassen in Zweiteilung begriffen.

Der Blepharoplast dringt in diesen Fällen niemals in den Nukleus ein und

não se podem dividir tais formas em *juvenes* e *adultas*. Grandes ou pequenas, ellas entram igualmente em multiplicação.

O blefaroplasto, nestes cazos, nunca penetra no nucleo, e efetua sua divizão independentemente deste.

O flajelo raramente se destaca do corpo do parasito; entretanto ha cazos em que elle desaparece totalmente (fig. 25, est. 8). Deve-se notar que o blefaroplasto, representado na fig. 25, est. 8, está em plano inferior, e não entre os dois cariozomas filhos, como parece á primeira vista.

A divizão nuclear parece efetuar-se por processo mitozico, como mostra a fig. 27, est. 8, onde os centriolos filhos, já envolvidos pelos cromozomos do cariozoma, estão ainda ligados pelo filamento central (centrodesmoze) existente no centro do fuзо acromatico.

Entretanto nunca nos foi possível verificar seu inicio.

Rompido o fuзо da divizão, os cariozomas afastam-se para o plasma onde constituem novos nucleos (figs. 25 e 27, est. 8).

Nunca podemos verificar si o blefaroplasto se divide por mitoze. A fig. 27, est. 8 mostra o cinetonucleo já dividido no plasma. Como aqui se vê, aquelle que ficou sem o flajelo (o da parte superior da figura) vai dar origem a outro, pela divizão que apresenta.

III. CULTURAS.

Foram feitas no meio de NOVY e MAC NEAL. Aí eram depositadas algumas gotas de sangue colhido aseticamente do coração.

Antes de semeado, o sangue era examinado a fresco ou em preparações côradas para saber-se qual das diversas formas predominava.

As culturas eram examinadas de trez em trez horas no primeiro dia, depois duas vezes ao dia, até o aparecimento das formas flajeladas longas.

De 15 a 25 dias estas formas vão diminuindo até desaparecerem por completo. Por isto nunca nos foi possível observar o fato referido por BOUET (1906),

vollzieht seine Teilung unabhängig von demselben.

Die Geissel löst sich selten vom Parasitenleibe ab, doch kömmt es vor, dass sie ganz verschwindet (Fig. 25, Taf. 8). Es muss bemerkt werden, dass der daselbst abgebildete Blepharoplast in einer tieferen Ebene liegt und nicht zwischen den beiden Tochterkaryosomen, wie es auf den ersten Blick erscheint.

Die Kernteilung erfolgt anscheinend durch Mitose, wie aus Fig. 27, Taf. 8 ersichtlich, wo die, schon von den Chromosomen des Karyosoms umgebenen, Tochterzentriolen noch durch ein zentrales Filament, eine Zentrodese, die in der achromatischen Spindel liegt, verbunden sind. Es war mir indessen nie möglich, das Anfangsstadium des Prozesses zu beobachten.

Nach Zerreißen der Teilungsspindel rücken die Karyosomen auseinander und bilden im Plasma neue Kerne (Fig. 25 und 27, Taf. 8).

Ob sich auch der Blepharoplast durch Mitose teilt, gelang mir niemals festzustellen. Fig. 27, Taf. 8 zeigt den Kinetonukleus bereits geteilt im Plasma und man sieht, dass der, ohne Geissel gebliebene, Tochterkern im obern Teil der Figur eine Teilung zeigt, welche zur Bildung eines neuen Kernes führen muss.

III. KULTUREN.

Ich machte Kulturen auf dem Medium von NOVY und MAC NEAL, indem ich einige Tropfen steril aus dem Herzen entnommenen Blutes auf dasselbe brachte. Vor der Aussaat wurde das Blut in frischen und gefärbten Präparaten untersucht, um festzustellen, welche Form darin vorherrschte.

Die Kulturen wurden am ersten Tage dreistündlich und nachher zweimal im Tage untersucht, bis lange geisseltragende Formen erschienen.

Vom 15ten bis zum 25ten Tage nahmen diese Formen ab, um endlich ganz zu verschwinden. Es war mir daher nicht

nas culturas antigas. Julgamos tão rápida extinção ser devida á temperatura ambiente que, no verão, regulava em media 28°.

As diversas formas do parasito, observadas logo nas primeiras horas depois de semeadas, comportam-se mais ou menos de modo identico.

As *grandes e pequenas formas longas* arredondam-se; as *arredondadas e largas* entram em intensa divizão binaria, e todas terminam pelo aparecimento de individuos flajelados, do quarto dia em diante. A divizão destas formas, aqui, constitue o fato observado por DANILEWSKY (1889) e DUTTON e TODD (1907), já referido. As pequenas formas longas passam por modificações interessantes.

Seu endoplasma vai se condensando em torno do nucleo e do blefaroplasto, e o periplasto, tornando-se mais frouxo, acaba por se destacar delle, como é apreciavel nas figs. 41 e 42, est. 8.

Os corpos redondos, aflajelados, vistos nos primeiros dias nas culturas, gozam de intenso poder de multiplicação.

O plasma delles apresenta a mesma estrutura já descrita para outros aspetos. O nucleo oferece, como nas formas jovens do sangue, grande riqueza de cromatina e plastina, apresentando um cariozoma volumoso. Deste partem trabeculas de linina que, atravessando a zona de suco nuclear, atinjem a face interna da membrana nuclear, havendo quazi sempre neste ponto granulações cromaticas.

O blefaroplasto oferece geralmente a forma de bastonetes e raras vezes é esferico. Elle divide-se, do mesmo modo que o trofonucleo, por processo binario, e esta divizão precede comumente a do nucleo principal, como vemos em qualquer das celulas da fig. 43, est. 8.

Nestas formas pode-se ver facilmente a formação do flajelo, á custa do blefaroplasto (figs. 43, est. 8, á esquerda e 44, est. 8). Os individuos flajelados são a principio esfericos (figs. 44 e 45), depois

möglich die von BOURT (1906) berichtete Erscheinung an alten Kulturen festzustellen. Ich schrieb das rasche Erlöschen derselben der Temperatur zu, welche im Sommer durchschnittlich 28° betrug.

In den ersten Stunden nach der Aussaat beobachtet, verhalten sich die verschiedenen Parasitenformen ungefähr gleich.

Die *grossen und kleinen Formen* runden sich ab, die *rundlichen und breiten* beginnen eine intensive Zweiteilung und schliesslich erscheinen bei allen, vom vierten Tage an, geisseltragende Formen. Diese Teilungen entsprechen den obigen, von DANILEWSKY (1889), sowie von DUTTON und TODD (1907) gemachten Beobachtungen.

Die kleinen langen Formen machen interessante Veränderungen durch. Das Endoplasma kondensiert sich um Blepharoplast und Nukleus, während der Periplast sich lockert und schliesslich ablöst, wie Fig. 41 und 42 auf Taf. 8 zeigen.

Die runden geissellosen Formen, welche man in den Kulturen während der ersten Tage sieht, zeigen eine intensive Vermehrungskraft.

Ihr Plasma besitzt die schon bei anderen Formen beschriebene Struktur. Der Kern zeigt, wie bei den jungen Blutformen, einen grossen Reichtum an Chromatin und Platin und enthält ein grosses Karyosom. Von letzterem gehen Lininbalken aus, welche die Kernsaftzone durchsetzen und die Innenfläche der Nuklearmembran erreichen, wobei man am letzteren Orte fast immer Chromatinkörner beobachtet.

Der Blepharoplast zeigt gewöhnlich Stäbchenform, seltener ist er rund. Er geht, wie der Trophonukleus, eine Zweiteilung ein, welche gewöhnlich derjenigen des Hauptkernes vorausgeht, wie man bei allen Zellen der Fig. 43, Taf. 8 sieht.

Bei diesen Formen erkennt man leicht die Bildung der Geissel auf Kosten des Blepharoplast (Taf. 8, Fig. 43 links und Fig. 44). Die geisseltragenden Individuen sind anfangs rund (Fig. 44 und 45),

alongam-se, adquirindo a forma de critídias.

Estas são de contorno um pouco variável, umas largas (figs. 47 e 49) outras figs. 54—56, est. 8) longas e finas.

Algumas culturas apresentavam, ao lado de critídias, formas tripanozomicas muito pequenas. A existencia de formas tripanozomicas em culturas foi observada, ainda ha pouco, por WOODCOCK (1910) no *Trypanosoma fringillinarum*.

As critídias do *Trypanosoma rotatorium* apresentam comumente aspetos tipicos; outras vezes, não oferecem grande nitidez, como se verá pela comparação das figuras 47—52, est. 8).

Em certas critídias o blefaroplasto caminha para traz do nucleo (fig. 53, est. 8), o que parece dar em resultado o aparecimento dos pequenos tripanozomos (figs. 54—56, Est. 8).

Estes são organismos finos, alongados, providos de membrana ondulante bem desenvolvida. Seu nucleo difere do das critídias por não apresentar trabeculas de linina, dispostas entre o cariozoma e a membrana nuclear; multiplicam-se por processo binario.

A figura 56, Est. 8, mostra o inicio da mitose do nucleo, indicada pela divizão previa do centriolo.

O blefaroplasto apresenta-se quasi sempre como bastonete, situado transversalmente, indicando tal aspeto inicio de divizão (figs. 54 e 56, est. 8).

Quando examinadas a fresco, pela natureza do movimento, distinguem-se facilmente estas formas das critídias.

As culturas feitas com sangue, em que existiam as *grandes e pequenas formas longas e arredondadas*, apresentavam, no fim de alguns dias, organismos tripanozomicos ao lado das critídias; quando no sangue semeado havia predominancia das *formas largas*, as culturas só apresentavam critídias.

IV. CONSIDERAÇÕES GERAIS.

Pelo que fica exposto, resulta claramente a dualidade de processos multipli-

dann verlängern sie sich und nehmen die Krithidienform an. Sie zeigen dann ein etwas wechselndes Bild, einige sind breit (Fig. 47 und 49), andere sehr verlängert. (Fig. 52, Taf. 8).

Einige Kulturen zeigten neben Krithidien kleine Trypanosomenformen. Das Vorkommen von solchen in Kulturen wurde vor kurzem von WOODCOCK bei *Trypanosoma fringillinarum* beobachtet.

Die Krithidien des *Trypanosoma rotatorium* zeigen gewöhnlich ein typisches Aussehen, manchmal sind sie aber nicht sehr deutlich, wie man durch Vergleichung der Fig. 47—52 auf Taf. 8 erkennt.

Bei manchen Krithidien rückt der Blepharoplast hinter den Kern (Fig. 53, Taf. 8), was dem Auftreten der kleinen Trypanosomen vorauszugehen scheint (Fig. 54—56, Taf. 8).

Diese Formen sind dünn, gestreckt und mit gut entwickelter undulierender Membran versehen. Ihr Kern unterscheidet sich dadurch von demjenigen der Krithidien, dass er zwischen Karyosom und Kernmembran keine Lininbälkchen zeigt. Er vermehrt sich durch Zweiteilung.

Fig. 56 auf Taf. 8 zeigt den Anfang einer Kernmitose, welche durch die vorausgehende Teilung des Zentriols angedeutet wird.

Der Blepharoplast erscheint fast immer als ein quergelagertes Stäbchen, was auf eine beginnende Teilung weist (Fig. 54 und 56, Taf. 8).

In frischen Präparaten lassen sich die Krithidienformen durch die Art ihrer Bewegung leicht unterscheiden.

Wurden die Kulturen mit Blut gemacht, in welchem grosse und kleine längliche und rundliche Formen vorkamen, so zeigten sie nach einigen Tagen Trypanosomen neben den Krithidien; herrschten dagegen im eingesäten Blute die breiten Formen vor, so fanden sich in den Kulturen nur Krithidien.

IV. ALLGEMEINE BETRACHTUNGEN.

Aus meinen Auseinandersetzungen erhellt deutlich eine Duplizität bei der

cativos no *Trypanosoma rotatorium*: divisão multipla e divisão binaria. A divisão, pela formação de multiplas unidades, é realizada nas *formas arredondadas*, provenientes das *grandes formas longas*, e dá em resultado, depois de terminado o processo, ás *pequenas formas longas*.

Em individuos pertencentes a qualquer destas formas existem tambem aspectos de duplicidade do nucleo, expressos pela maior ou menor riqueza cromatica.

Nas *formas arredondadas*, só nos foi possivel surpreender tal dualidade, depois de efetuada a divisão nuclear. Expressa-se ella, aqui, pelo aparecimento do blefaroplasto que, em alguns cazos (como na fig. 13, est. 7), se realiza logo que os nucleos filhos se acham no plasma, e em outros (como nas figs. 14, 15, 18, est. 7) só apparece muito tardiamente, num momento em que as celulas filhas, já formadas, estão a desagregar-se. A divisão binaria efetua-se em organismos de aspetos muito variados, os quais são todavia bem caracterizados pela disposição do nucleo e da membrana ondulante, muito larga e com franjas profundas.

Estes fatos tornam-se de facil compreensão desde que sejam comparados aos resultados das minuciozas pesquisas de CHAGAS sobre o *Schizotrypanum cruzi*, as quais foram, para nós, uma preciosa base de orientação.

No *Schizotrypanum* ha dois processos de multiplicação: a divisão multipla no pulmão do vertebrado e a divisão binaria de formas aflajeladas, semelhantes a uma *Leishmania*, que se passa nas fibras musculares e em diversos tecidos.

De recente verificação, este processo está conhecido por uma conferencia realizada pelo autor e pela noticia de HARTMANN (Arch. f. Protistenkunde, 1910).

No pulmão notam-se dois aspetos do parasito: um em que elle perde o blefaro-

Vermehrung des *Trypanosoma rotatorium*, nämlich multiple und binäre Teilung. Die Teilung unter Bildung vieler Teilindividuen vollzieht sich bei den *abgerundeten*, von den *grossen länglichen* abgeleiteten Formen und führt, nach Vollendung des Prozesses, zu den *kleinen länglichen Formen*.

Bei den Individuen, welche zu irgend einer dieser Formen gehören, findet sich auch eine Duplizität im Aussehen der Kerne, welche sich in grösserem oder geringerem Chromatinreichtum ausdrückt.

Bei den runden Formen konnte ich eine solche Dualität nur nach stattgefundener Kernteilung entdecken. Hier zeigt sie sich durch das Erscheinen des Blepharoplasts, welches in einigen Fällen, wie in Fig. 13 auf Taf. 7, sich sofort vollzieht, sobald die Tochterkerne ins Plasma übergetreten sind, in andern, wie in Fig. 14, 15, 18 auf Taf. 7, erst sehr spät auftritt, wenn die bereits gebildeten Tochterzellen anfangen auseinanderzuweichen. Die binäre Teilung findet sich bei Formen von sehr verschiedenem Aussehen, die jedoch immer durch die Anordnung des Kernes und die breite und stark ausgebuchtete undulierende Membran gekennzeichnet sind.

Diese Tatsachen sind leicht zu verstehen, wenn man sie mit den Resultaten der eingehenden Untersuchungen von CHAGAS über *Schizotrypanum cruzi* vergleicht, welche bei meinen Untersuchungen als wertvolle Grundlage dienen.

Dem *Schizotrypanum* kommen zwei Arten der Vermehrung vor: eine multiple Teilung in den Lungen des Wirbeltieres und eine Zweiteilung geisselloser Formen, ähnlich einer *Leishmania*, welche in den Muskelfasern und in verschiedenen Geweben vorkommt.

Dieser neuerdings festgestellte Vorgang ist durch einen Vortrag des Autors und eine Notiz von HARTMANN (Arch. f. Protistenkunde 1910) bekannt geworden.

In den Lungen beobachtet man zwei Formen des Parasiten, eine, in welcher er den Blepharoplast einbüsst und eine

plasto, outro em que este persiste, fundindo-se ao nucleo principal.

Rezulta daí apresentarem as células filhas, precocemente ou não, um blefaroplasto, conforme provieram dum ou de outro caso.

Está perfeitamente estabelecido que esta divisão no pulmão é uma gametogénese distinguível, conforme o aparecimento precoce do blefaroplasto ou a sua ausência, em micro- e macrogametogonia.

As formas de divisão nos musculos e tecidos constituem o tipo asexuado do protozoario.

Observa-se no *Trypanosoma rotatorium* a repetição dos fatos precedentes.

Por isto consideramos as *grandes formas longas* como sexuadas, e segundo a maior ou menor riqueza cromatica do nucleo, como machas ou femeas (figs. 1—4, est. 7).

As *formas arredondadas*, estádios mais adiantados das precedentes, apresentarão naturalmente esta dualidade; mas não nos foi possível observar o inicio da divisão das formas femeas, o qual seria representado pela perda do blefaroplasto (como acontece no *Schizotrypanum*); nem a terminação da divisão das formas machas, a qual seria expressa pela existencia dum blefaroplasto nas unidades jovens (como faz supor a observação da figura 13, est. 7).

Assim, acreditamos que as figuras 5 a 12 representam, pela fusão do cineto- ao trofonucleo, formas machas, das quais o periodo mais adiantado da microgametogonia, que observámos, é representado pela figura 13, est. 7, onde já é visto um blefaroplasto ligado a alguns dos nucleos filhos.

As figs. 14 a 19, est. 7, pensamos que representam, devido á ausencia quasi constante de blefaroplasto nas unidades

andere, in welcher er persistiert, aber mit dem Hauptkerne verschmilzt.

In Folge dessen zeigen die Tochterzellen den Blepharoplast frühzeitig oder nicht, je nachdem sie von der einen oder anderen Form abstammen.

Es steht fest, dass diese Teilung in der Lunge eine Gametogenese ist, welche, je nach dem frühzeitigen Erscheinen des Blepharoplasts oder seinem Fehlen, in eine Mikro- und Makrogametogonie geteilt werden kann.

Die Teilungsprozesse in den Muskeln und Geweben bilden den asexuellen Typus des Protozoen.

Beim *Trypanosoma rotatorium* beobachtet man eine Wiederholung dieser Tatsache.

Deswegen spreche ich die *grossen länglichen Formen* als geschlechtliche an und zwar, je nach dem grösseren oder geringeren Chromatinreichtum des Kerns, als männliche oder weibliche (Fig. 1—4, Taf. 7).

Die *abgerundeten Formen* stellen ein vorgerückteres Stadium jener dar und werden daher natürlicherweise dieselbe Dualität zeigen; doch war es mir nicht möglich, den Anfang der Teilung der weiblichen Formen zu beobachten, welcher sich, wie beim Schizotrypanum durch Verlust des Blepharoplasts kennzeichnen würde; noch das Ende der Teilung der männlichen Formen, welche sich durch das Vorkommen eines Blepharoplasts bei den jungen Teilindividuen verraten würde, wie man nach Fig. 13 schliessen kann.

Demgemäss glaube ich, das Fig. 5 und 12 wegen Verschmelzung von Kineto- und Trophonukleus männliche Formen darstellen, deren vorgerücktestes, zur Beobachtung gekommenes Mikrogametogoniestadium in Fig. 13 auf Taf. 7 dargestellt ist, wo man bereits einen Blepharoplasten mit einigen der Tochterkernen verbunden sieht.

Wegen des fast konstanten Fehlens eines Blepharoplasts bei den Teilindividuen, glaube ich, dass Fig. 14 und 19 eine Makrogametogonie bedeuten, welche

constituídas, uma macrogametogonia, a qual seria proveniente das formas arredondadas que perderam o blefaroplasto ao iniciar-se a divisão.

A gametogonia dá origem a pequenos tripanozomos que, como já foi referido, apresentam dois aspetos bem distintos, os quais julgamos macho e fêmeo conforme a riqueza cromática do núcleo (fig. 22, 23, est. 7).

Estes gametos, uma vez que não sejam retirados do organismo do vertebrado pela picada do transmissor, serão destruídos ou sofrerão algumas modificações?

Acreditamos que alguns possam atingir as dimensões das grandes formas longas e que outros, depois de adaptados ao meio hemático, de que falaremos adiante, se transformem nas *formas largas*.

As figs. 28, 27, est. 8, representam justamente o ponto intermediário entre os gametos (figs. 22 e 23, est. 7) e as *grandes formas longas* (figs. 30 e 31, est. 8).

Como já dissemos, não nos foi possível colher resultados sobre a transmissão deste parasito, pelo que não podemos saber si os indivíduos, destinados á copulação no organismo do transmissor, são representados aqui pelas *grandes* ou pelas *pequenas formas longas*. Devemos notar que nunca nos foi dado observar estádios de divisão destas ultimas no sangue das rãs.

As formas sexuadas, como já foi referido acima, diminuem muito em numero, chegando a desaparecer nas infeções antigas.

Isto parece em contradição com fatos observados em certos hematozoários em que os indivíduos sexuais aparecem em periodo mais ou menos adiantado da infeção.

Como é sabido, a sexualidade exprime condições desfavoráveis devidas, principalmente, ás reações defensivas do organismo parasitado ou de agentes terapeuticos.

Em tripanozomo não patojénico, como é o caso presente, um dos periodos mais

von den runden Formen abstammt, die den Blepharoplast zu Anfang der Teilung verloren haben.

Die Gametogonie führt zur Bildung kleiner Trypanosomen, die, wie schon erwähnt, ein zweifaches Bild zeigen und die wir, je nach dem grösseren oder geringeren Chromatinreichtum, als männliche oder weibliche auffassen (Fig. 22 und 23).

Es fragt sich, ob diese Gameten zerstört werden oder Veränderungen erleiden, wenn sie nicht durch einen Schmarotzer dem Blute des Wirbeltieres entzogen werden. Ich glaube, dass einige derselben die Dimensionen der grossen länglichen Formen erreichen können und andere sich nach einer gewissen Anpassung an das Blutmedium in *breite Formen* verwandeln. Die Fig. 28 und 29 zeigen gerade den Uebergang von den Gameten (Fig. 22 und 23) zu den *grossen länglichen Formen* (Fig. 30 und 31, Taf. 8).

Wie gesagt, konnte ich über die Uebertragung der Parasiten nicht eruiren, so dass ich nicht sagen kann, ob die zur Kopulation im Organismus des Uebertrögers bestimmten Formen hier durch die *grossen* oder durch die *kleinen* länglichen Individuen repräsentiert sind. Es muss bemerkt werden, dass ich von letzteren niemals Teilungsstadien im Blute der Frösche beobachten konnte.

Wie schon oben gesagt, vermindert sich die Zahl der geschlechtlichen Tiere und in alten Infectionen können sie gänzlich verschwinden. Es bildet dies scheinbar einen Widerspruch zu den Beobachtungen an gewissen Hämatozoen, bei welchen die geschlechtlichen Individuen in einer mehr oder weniger vorgeschrittenen Periode der Infektion erscheinen.

Wie bekannt, deutet die Sexualität ungünstige Lebensbedingungen an, wie sie besonders durch Abwehrreaktionen des Organismus oder therapeutische Agentien veranlasst werden.

Bei nicht pathogenen Trypanosomen ist, wie im vorliegenden Falle, die kritische Lebensphase diejenige, in welchem er aus

precarios de sua vida é justamente aquelle em que elle passa, do hospede transmissor, para o meio hematico do vertebrado.

Tal passagem ocasiona naturalmente a conservação das fórmãs mais rezistentes até que o parasito se adapte ao novo *habitat*. Isto explica o fato observado no *Trypanosoma rotatorium*.

As observações feitas sobre este hematozoario autorizam a extensão dos caracteres do genero *Trypanosoma*, ao qual elle serve de tipo.

Por isso, formulamos a seguinte diagnose do genero: Organismos alongados, munidos de dois nucleos, um anterior, e outro posterior; deste ultimo parte o flajelo que, percorrendo a borda da membrana ondulante, oferece uma porção livre. *Apresentam dois processos de multiplicação: divisão multipla, para as fórmãs sexuadas, distinguível em macro- e microgametogonia; e divisão binaria para as fórmãs indiferentes ou assexuadas.*

E' possivel que pesquisas mais minuciozas venham demonstrar a existencia dos dois processos de multiplicação em outros tripanozomos, pelo que não estabelecemos para estes um novo genero.

Atualmente sabemos por comunicação oral do Prof. BERTARELLI, que em seu laboratorio foram vistas fórmãs de gametogonia do *Trypanosoma lewisi* no pulmão de ratos; tambem neste Instituto o Dr. G. VIANNA constatou a dualidade dos processos multiplicativos nos *Trypanosoma gambiense*, *equinum* e *congolense*.

Ao terminar, deixamos aqui registados os nossos sinceros agradecimentos ao illustre mestre Dr. OSWALDO CRUZ pelo generoso acolhimento com que demaziado nos honra, e ao Dr. CARLOS CHAGAS que, diariamente, nos dispensa lições das mais sabias e proveitozas.

Manguinhos, Março de 1911.

dem Ueberträger ins Blut der Wirbeltiere tritt.

Ein solcher Vorgang führt natürlicherweise zur Konservation gewisser, mehr widerstandsfähiger Formen, bis der Parasit sich an den neuen Wohnort gewöhnt hat. So erklärt sich das beim *Trypanosoma rotatorium* beobachtete Verhalten.

Die bei unserem Blutparasiten gemachten Beobachtungen rechtfertigen eine Erweiterung der Kennzeichen des Genus *Trypanosoma*, dem er als Typus dient.

Demgemäss formuliere ich die Diagnose dieser Gattung folgendermassen: Längliche Organismen mit zwei Kernen, einem vorderen und einem hinteren; von letzterem geht die Geissel aus, welche, nachdem sie den Rand der undulierenden Membran durchlaufen, in ein freies Stück endigt. *Sie zeigen zwei Vermehrungsarten: eine vielfache Teilung bei den geschlechtlichen Formen, welche eine Makro- und Mikrogametogonie unterscheiden lässt, und eine Zweiteilung bei den geschlechtslosen oder indifferenten Formen.*

Es ist möglich, dass eingehendere Untersuchungen das Vorkommen dieser bei den Teilungsarten auch bei anderen Trypanosomen erweisen wird, weshalb ich für dieselben kein neues Genus aufstelle.

Heute weiss ich aus einer mündlichen Mitteilung von Prof. BERTARELLI, dass in seinem Laboratorium Gametogonienformen von *Trypanosoma lewisi* in den Lungen von Ratten beobachtet wurden; auch in unserem Institute wurde von Dr. G. VIANNA eine Dualität der Vermehrungsprozesse bei *Trypanosoma gambiense*, *equinum* und *congolense* festgestellt.

Zum Schlusse spreche ich meinem verehrten Lehrer Herrn Dr. OSWALDO CRUZ für seine freundliche Aufnahme im Institute und Herrn Dr. CARLOS CHAGAS für seine fortgesetzte wertvolle Belehrung meinen aufrichtigsten Dank aus.

Manguinhos, März 1911.



